动 物 学 研 究 2010，Aug. 31(4): 345−352　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2010.04345

基于 *COI* 序列的 DNA 条形码在中国沿海缀锦蛤亚科贝类中的应用分析

陈　军，李　琪*，孔令锋，郑小东，于瑞海

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室，山东 青岛　266003)

摘要：该研究探讨了将 *COI* 序列应用于中国沿海缀锦蛤亚科贝类物种鉴定的可行性，获得了该亚科 5 属 11 种贝类 51 个个体的 43 个单倍型序列。碱基替换饱和性分析表明，颠换未出现饱和现象，而转换在序列分化达到 10%至 15%时即到达饱和。单倍型 Hap33 可能是由杂交引起的，排除此单倍型，种内个体间遗传距离在 0%到 2.02%之间，平均为 0.46%，属内不同种个体间遗传距离在 17.21%～32.24%之间，平均为 24.96%，存在条形码间隙；11 种缀锦蛤亚科贝类在邻接树和贝叶斯树上都独立的单系群。该研究表明，基于 *COI* 的 DNA 条形码技术能够将研究所涉及的约 98%的缀锦蛤亚科贝类鉴定到种的水平，因此，利用 DNA 条形码技术可以对缀锦蛤亚科贝类进行有效地分类鉴定。

关键词：缀锦蛤亚科; DNA 条形码; *COI* 序列; 物种鉴定
中图分类号：Q959.215; Q3491; Q951.3　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0254-5853-(2010)04-0345-08

COI-based DNA Barcoding in Tapetinae Species (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) Along the Coast of CHINA

CHEN Jun, LI Qi*, KONG Ling-Feng, ZHENG Xiao-Dong, YU Rui-Hai

(*Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao* 266003, *China*)

Abstract: DNA barcoding has exhibited charming effectiveness in species diagnosis, but some studies suggested the proportion of taxa that cannot be barcode-distinguished was still high. In the present study, the efficiency of the DNA barcoding for delimiting species of subfamily Tapetinae along the coast of China was tested. Fifty one original *COI* sequences of 11 species in five genera were analyzed. Among these sequences, 43 haplotypes were identified. Saturation plots generated for DNA barcode revealed that transitions became saturated after 10% to 15% sequence divergence. However, transversions were not saturated. Excluding *Ruditapes variegata* haplotype Hap33 that might be the result of a hybridization event, our finding showed that K2P-distances between conspecific sequences varied from 0% to 2.02% (0.46% on average), distances between congeneric sequences were from 17.21% to 32.24% (24.96% on average), and all conspecifics clustered together in the phylogentic trees. The proportion of individuals that can be distinguished by DNA barcoding was approximately 98% among 51 individuals analyzed in this study. Thus, the results evidenced that subfamily Tapetinae species can be efficiently identified through the use of DNA barcoding.

Key words: Tapetinae; DNA Barcoding; *COI* sequences; Species identification

缀锦蛤亚科(Tapetinae)贝类隶属于软体动物门(Mollusca) 双壳纲 (Bivalvia) 帘蛤科 (Veneridae)，是一种在世界范围均有分布的贝类。Fischer-Piette & Metivier(1971)对缀锦蛤亚科分类订正的专著中记录该亚科现生种类共 106 种。缀锦蛤亚科贝类在我国有 6 属 21 种，分布于从南到北各海区(Zhuang, 2001)。缀锦蛤亚科贝类很多种类形态可塑性很大，近缘种之间形态差异细微，相当大一部分缀锦蛤亚科贝类种间关系一直存在争议，国内外学者始终没有统一的看法 (Keen, 1951; Habe, 1977; Harte, 1992; Zhuang, 2001)。例如菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)由于贝壳形态、壳表颜色、壳表花纹

收稿日期：2010-01-27；接受日期：2010-04-27
基金项目：国家高技术研究发展计划项目(2007AA09Z433)；教育部培育资金项目(707041)
*通讯作者(Corresponding author)，E-mail: qili66@ouc.edu.cn
第一作者简介：陈军，男，博士，研究方向为贝类分类与系统发生；E-mail: yijianweish@gmail.com

等变化很大，早期分类学家将其定为 *dentivulata*、*indica*、*violascens*、*japoniaca*、*semidecussata*、*bifurcata* 和 *philippinarum* 等 7 个种。而在国内，菲律宾蛤仔往往被定名为与其形态相近的姊妹种杂色蛤仔(*Ruditapes variegata*) (Zhuang, 2001)。

Hebert et al (2003)提出利用线粒体细胞色素 c 氧化酶 I(*COI*)基因构建物种鉴别体系，即 DNA 条形码技术(DNA barcoding)。近年来，许多研究证实了基于 *COI* 的 DNA 条形码在物种鉴定、隐存种发现等方面具有强大的功能(Ball et al, 2005; Johnson et al, 2008; Schlei et al, 2008)。DNA 条形码的理论基于两个假设：一是种内遗传差异小于种间遗传差异，即存在条形码间隙(barcoding gap)；二是在系统发生上种与种之间互为单系群(monophyletic group) (Toffoli et al, 2008)。有些研究表明，在大规模采样情况下，随着地理群体的增多，一些生物类群种内遗传差异会显著提高，而种间遗传差异也会因姊妹种的存在而降低，甚至导致种内遗传差异与种间遗传差异相互重叠，从而导致条形码间隙的消失。但即便是在这种情况下，在由 DNA 条形码(DNA barcode)构建的系统树中种与种之间依然相互保持单系性，因此 DNA 条形码技术仍然是一种有效的鉴定物种的分子工具(Ekrem et al, 2007; Ward et al, 2008; Ward et al, 2009)。当然，也有研究者认为由于基因渗入(introgression)和不完全支系分选(incomplete lineage sorting)等现象的存在，以 *COI* 为基础的 DNA 条形码技术在某些生物类群中是不适用的(Toffoli et al, 2008)。

由于能够提供丰富的进化信息，*COI* 已经在贝类的系统发生、群体遗传等研究中得到成功应用(Chen et al, 2009; Shen et al, 2009; Zheng et al, 2009)，但是国内尚未有关于能否将 *COI* 应用于贝类条形码研究的相关报道。本研究分析了中国沿海 5 属 11 种缀锦蛤亚科贝类 51 个个体的 *COI* 序列，拟解决下列问题：(1)所研究的缀锦蛤亚科贝类 *COI* 序列之间是否存在条形码间隙；(2)缀锦蛤亚科不同种类之间是否在系统树上呈现相互单系性；(3)将基于 *COI* 基因的 DNA 条形码技术应用于缀锦蛤亚科贝类分类鉴定中是否具有可行性。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究共选取中国沿海缀锦蛤亚科哥特蛤属(*Marcia*)、缀锦蛤属(*Tapes*)、浅蛤属(*Gomphina*)、巴非蛤属(*Paphia*)和蛤仔属(*Ruditapes*)5 属 11 种贝类 51 个个体。除浅蛤属在中国只有一个种有分布外，其余每个属至少取两个种。每个种至少 3 个个体，包含在至少两个取样点中。选取与缀锦蛤亚科亲缘关系最近的镜蛤亚科中的日本镜蛤(*Dosinia japonica*)为外类群。研究所采用标本均固定保存于 95%酒精中。研究所用样品的种属名、采集地、样品编号、单倍型编号、GenBank 序列号等详细信息见表 1。

1.2 DNA 扩增及测序

采用常规苯酚氯仿法抽提样品 DNA。目的片段扩增时先采用 *COI* 通用引物序列：LCO1490(5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')和 HC02198(5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')(Folmer et al，1994)。对于使用这对引物无法成功扩增、测序的样品，采用以下引物序列进行扩增：LCO1490-Ven(5'-ATTATTCAGAACCAATCATAAAGATATTGG-3')和 HCOI-900Ven(5'-TGTAGGAATAGCAATAATAAAAGTTAC-3')(Kappner & Bieler, 2006)。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR 采用 50 μL 反应体系，含 1× buffer，$MgCl_2$ 2 mmol/L， dNTP 200 μmol/L，DMSO 0.56 mmol/L，*Taq* 聚合酶(TaKaRa)2 U，正、反引物各 10 μmol/L，模板 DNA 100 ng。PCR 反应参数为：94℃预变性 3 min；94℃变性 40 s，40℃退火 40 s，72℃延伸 1 min，5 个循环后，94℃变性 40 s，48～53℃(根据不同种类的 DNA 模板及不同引物)退火 40 s，72℃延伸 1 min，共 28 个循环；最终 72℃延伸 5 min。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后由上海生物工程有限公司进行双向测序。

1.3 数据分析

利用 DNAStar 7.2.1 软件包中的 SeqMan 进行正反向拼接，当正反序列出现不配对情况时，查阅荧光图谱进行校正；得到的一致序列在 Bioedit 7.0.9 软件(Hall, 1999)内置的 claustal W 程序(Thompson et al, 1994)进行排序并去掉正反向引物序列。

使用 MEGA 4.1(Tamura et al, 2007)统计所得序列的碱基组成、保守位点数、变异位点数和序列间的转换颠换频率比值；使用 DNAsp 5.00.04 (Rozas et al, 2003)计算简约信息位点数。由于 Kimura 双参数距离模型(K2P；Kimura, 1980)被认为是评估低遗传

表 1　分析的样品及其序列单倍型

Tab. 1　List of analyzed specimens with haplotype numbers

物种 Taxon	学名 Latin name		样品编号 ID	采集地 Site of collection	单倍型编号 Haplotype No.	GenBank 序列号 Accession No.
	属 Genus	种 Species				
巴非蛤	*Paphia*	*papilionacea*	BFG01	山东威海	Hap1	GQ855238
			BFG02	山东威海	Hap2	GQ855239
			BFG03	山东威海	Hap3	GQ855240
			BFG04	山东威海	Hap4	GQ855241
			BFG05	山东青岛	Hap5	GQ855242
			BFG06	山东青岛	Hap6	GQ855243
波纹巴非蛤		*undulata*	BWBFG01	广东阳江	Hap7	GQ855244
			BWBFG02	广西防城港	Hap8	GQ855245
			BWBFG03	广西北海	Hap9	GQ855246
			BWBFG04	广西防城港	Hap10	GQ855247
锯齿巴非蛤		*gallus*	JCBFG01	广西北海	Hap11	GQ855248
			JCBFG02	海南儋州	Hap12	GQ855249
			JCBFG03	广西北海	Hap13	GQ855250
和蔼巴非蛤		*amabilis*	HABFG01	广西北海	Hap14	GQ855251
			HABFG02	海南文昌	Hap14	GQ855251
			HABFG03	海南三亚	Hap15	GQ855252
			HABFG04	广西北海	Hap16	GQ855253
			HABFG05	海南三亚	Hap17	GQ855254
裂纹哥特蛤	*Marcia*	*hiantiana*	LWGTG01	广西北海	Hap18	GQ855255
			LWGTG02	海南三亚	Hap19	GQ855256
			LWGTG03	海南陵水	Hap19	GQ855256
			LWGTG04	广东茂名	Hap19	GQ855256
			LWGTG05	海南三亚	Hap20	GQ855257
日本哥特蛤		*japonica*	RBGTG01	海南三亚	Hap21	GQ855258
			RBGTG02	海南三亚	Hap22	GQ855259
			RBGTG03	海南三亚	Hap23	GQ855260
			RBGTG04	海南文昌	Hap24	GQ855261
			RBGTG05	海南文昌	Hap25	GQ855262
菲律宾蛤仔	*Ruditapes*	*philippinarum*	FLBGZ01	山东青岛	Hap26	GQ855263
			FLBGZ02	山东荣成	Hap27	GQ855264
			FLBGZ03	浙江南麂	Hap28	GQ855265
			FLBGZ04	广西北海	Hap29	GQ855266
			FLBGZ05	福建漳浦	Hap30	GQ855267
杂色蛤仔		*variegata*	ZSGZ01	广西北海	Hap31	GQ855268
			ZSGZ02	广西涠洲	Hap32	GQ855269
			ZSGZ03	海南儋州	Hap33	GQ855270
			ZSGZ04	广西北海	Hap34	GQ855271
			ZSGZ05	海南三亚	Hap34	GQ855271
等边浅蛤	*Gomphina*	*aequilatera*	DBQG01	广东阳江	Hap35	GQ855272
			DBQG02	广西北海	Hap36	GQ855273
			DBQG03	广西北海	Hap37	GQ855274
			DBQG04	广西北海	Hap38	GQ855275
			DBQG05	浙江舟山	Hap39	GQ855276
钝缀锦蛤	*Tapes*	*dorsatus*	DZJG01	广西北海	Hap40	GQ855277
			DZJG02	广西北海	Hap40	GQ855277
			DZJG03	广西涠洲	Hap40	GQ855277
缀锦蛤		*literatus*	ZJG01	海南三亚	Hap41	GQ855278
			ZJG02	海南三亚	Hap41	GQ855278
			ZJG03	海南陵水	Hap42	GQ855279
			ZJG04	海南三亚	Hap43	GQ855280
			ZJG05	海南文昌	Hap43	GQ855280
日本镜蛤*	*Dosinia*	*japonica*	RBJG	海南三亚	Ougroup	GQ855281

* 表示外类群(* means outgroup)。

变异序列差异的最佳替代模型(Nei & Kumar, 2000)，所以使用 MEGA 计算了基于 K2P 的种内不同个体的间遗传距离和属内不同种个体间的遗传距离。应用 DNAsp 对所获得序列含有的单倍型(haplotype)进行统计。利用 DAMBE 5.0.85(Xia et al, 2001)进行核苷酸转换与颠换的饱和性分析。

以日本镜蛤为外类群，利用所得单倍型重构系统发生树。使用 MEGA 构建基于 K2P 的邻接树(neighbor-joining tree, NJ)；各分支置信度由自检举(bootstrap)分析 1 000 次获得。由于基于距离的邻接法会造成进化信息的丢失，从而导致邻接树不能反映真实的系统发生关系(Desalle et al, 2005)，所以利用 MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003)构建 BI 树；由 jModelTest 0.1.1(Posada, 2008)分析得出其最佳进化替代模型为 GTR+I+G；在缺省的马可夫蒙特卡洛(MCMC)参数下运行二百万代，每 100 代抽样一次，前 4 000 代作为老化样本(burn-in samples)舍去；BI 树各分支置信度以后验概率(posterior probability, PP)表示。使用 Treeview (Page, 1996)显示 MP 树和 BI 树的拓扑结构图。

2 结 果

2.1 序列特征

LCO1490 和 HCO2198 扩增所得序列长度为 658 bp，LCO1490-Ven 和 HCOI-900Ven 扩增的序列长度为 874 bp。对两对引物扩增所得的共同序列区域进行分析，未发现插入和缺失位点(indels)，A、T、C、G 平均含量分别为 23.7%、40.7%、14.2%、21.4%，其中 C+G 平均含量为 35.6%，远低于 A+T 平均含量(64.4%)。第三密码子位点的 C+G 平均含量最低，为 24.1%，第一密码子位点 G+C 含量(42.4%)略高于第二密码子 G+C 含量(40.3%)。在分析的缀锦蛤亚科贝类中，G+C 含量最低的为哥特蛤属(34.4%)，最高的为浅蛤属(36.5%)，各属间 G+C 平均含量差异不大。缀锦蛤亚科 *COI* 序列核苷酸碱基构成出现了明显的偏倚现象，符合线粒体碱基组成的特点。

获得的缀锦蛤亚科贝类 51 个序列共定义了 43 个单倍型(表 1)。其中，和蔼巴非蛤(*Paphia amabilis*)个体 HABFG01 和 HABFG02 共享单倍型 Hap14；裂纹哥特蛤(*Marcia hiantiana*)个体 LWGTG02、LWGTG03 和 LWGTG04 共享单倍型 Hap19；杂色蛤仔个体 ZSGZ04 和 ZSGZ05 共享单倍型 Hap34；钝缀锦蛤 (*Tapes dorsatus*) 3 个个体共享单倍型 Hap40；缀锦蛤(*Tapes literatus*)个体 ZJG01 和 ZJG02 共享单倍型 Hap41，个体 ZJG04 和 ZJG05 共享单倍型 Hap43。其余样品均为单一序列单倍型。不同种之间未出现共享单倍型现象。

在 658 个位点中，保守位点数为 314 个，约占总数的 47.7%；变异位点数为 344 个，其中简约信息位点数为 340 个。序列变异主要发生在密码子的第三位点，其变异位点数，约占总变异位点数的 56.4%。序列间所有位点的转换/颠换比率为 0.94。碱基替换饱和性分析表明缀锦蛤亚科贝类 *COI* 序列之间颠换未出现饱和现象，而转换在序列分化达到 10%～15%时即到达饱和。

2.2 条形码间隙

表 2 基于 K2P 模式的缀锦蛤亚科种内不同个体和属内不同种个体间遗传距离
Tab. 2 Conspecific and congeneric divergences (K2P) of Tapetinae

属名 Genus name	种类数 Species No.	种内个体间遗传距离(%) Conspecific divergence (K2P)			属内不同种个体间遗传距离(%) Congeneric divergence (K2P)		
		最小值 Min	最大值 Max	平均值 Mean	最小值 Min	最大值 Max	平均值 Mean
巴非蛤属 *Paphia*	4	0.00	0.61	0.32	17.21	32.24	24.75
哥特蛤属 *Marcia*	2	0.00	0.76	0.18	19.33	19.92	19.65
蛤仔属 (不含 ZSGZ03) *Ruditapes* (Excluding ZSGZ03)	2	0.00	2.02	0.85	28.99	29.67	29.46
蛤仔属 (含 ZSGZ03) *Ruditapes* (Including ZSGZ03)	2	0.00	29.39	6.01	0.20	29.67	23.75
浅蛤属 *Gomphina*	1	0.15	1.86	1.08	—	—	—
缀锦蛤属 *Tapes*	2	0.00	0.46	0.27	29.33	29.58	29.47
所有类群 (不含 ZSGZ03) Total (Excluding ZSGZ03)	11	0.00	2.02	0.46	17.21	32.24	24.96

条形码间隙的存在依赖于种间遗传多样性水平要高于种内遗传多样性水平。由表 2 可知，本研究中种内最大遗传距离发生于杂色蛤仔内：海南儋州单倍型Hap33与其它杂色蛤仔单倍型之间遗传距离在 28.94%～29.39%之间，远远高于种内平均遗传距离(0.46%)。属内不同种个体间最小遗传距离发生于海南儋州杂色蛤仔单倍型Hap33与福建漳浦菲律宾蛤仔单倍型 Hap30 之间，仅为 0.20%。而且杂色蛤仔单倍型Hap33在系统发生树上聚于由菲律宾蛤仔构成的分支上(详见 2.3)。我们分析此单倍型可能是由于杂交等因素引起的(详见 3)。剔除该单倍型，种内个体间最大遗传距离为 2.02%(菲律宾蛤仔山东青岛单倍型与山东荣成单倍型之间)，属内不同种个体间最小遗传距离为 17.21%(海南三亚和蔼巴非蛤单倍型 Hap15 与山东青岛巴非蛤(*Paphia papilionacea*)单倍型 Hap5 之间)。剔除问题单倍型 Hap33，缀锦蛤亚科属内不同种个体间遗传距离远远大于种内不同个体间遗传距离，此亚科基于 *COI* 的 DNA 条形码间隙是存在的(图 1)。

2.3　分子系统发生树

在 NJ 和 BI 三种系统树上，除杂色蛤仔单倍型 Hap33 与菲律宾蛤仔单倍型聚合在同一分支上之外，其余缀锦蛤亚科贝类种类均单独形成单系群，并且具有很高的支持度：NJ 树种水平形成的单系节点处自检举值为 82%～99%，平均为 94%；BI 树种水平形成的单系节点处后验概率值只有在等边浅蛤(*Gomphina aequilatera*)处为 0.93，在菲律宾蛤仔处为 0.95，其余均为 1.00。杂色蛤仔 Hap33 单倍型与菲律宾蛤仔的全部单倍型共同在 NJ 和 BI 树上形成了置信度很高的单系群。在两种系统树上，海南儋州杂色蛤仔单倍型Hap33与福建漳浦菲律宾蛤仔单倍型 Hap30 形成独立分支后，再与菲律宾蛤仔其他个体单倍型形成的分支聚合，表明这两个单倍型序列之间亲缘关系较它们与菲律宾蛤仔其余单倍型序列间亲缘关系更近(图 2)。

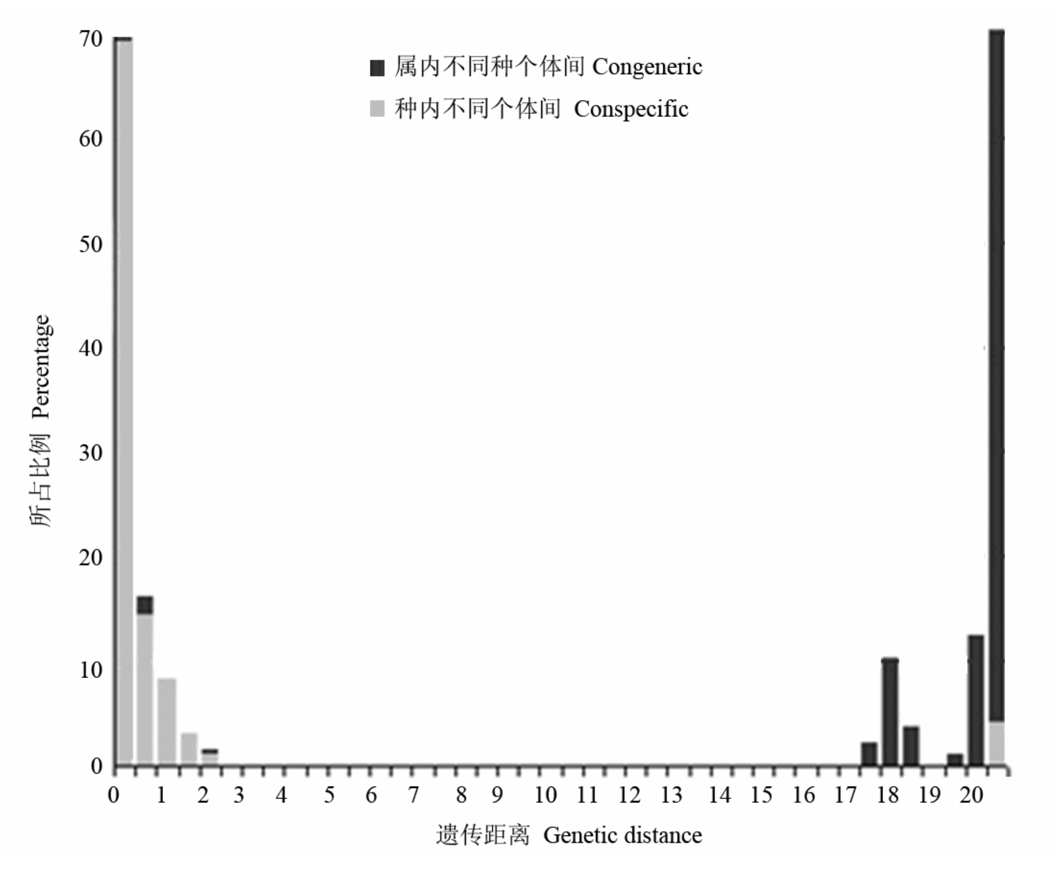


图 1　同种个体和同属不同种个体间 *COI* 序列遗传距离(基于 K2P)分布情况

Fig.1　Distribution of *COI* distances among individuals of the same species (conspecific), individuals of the same genus but different species (congeneric)

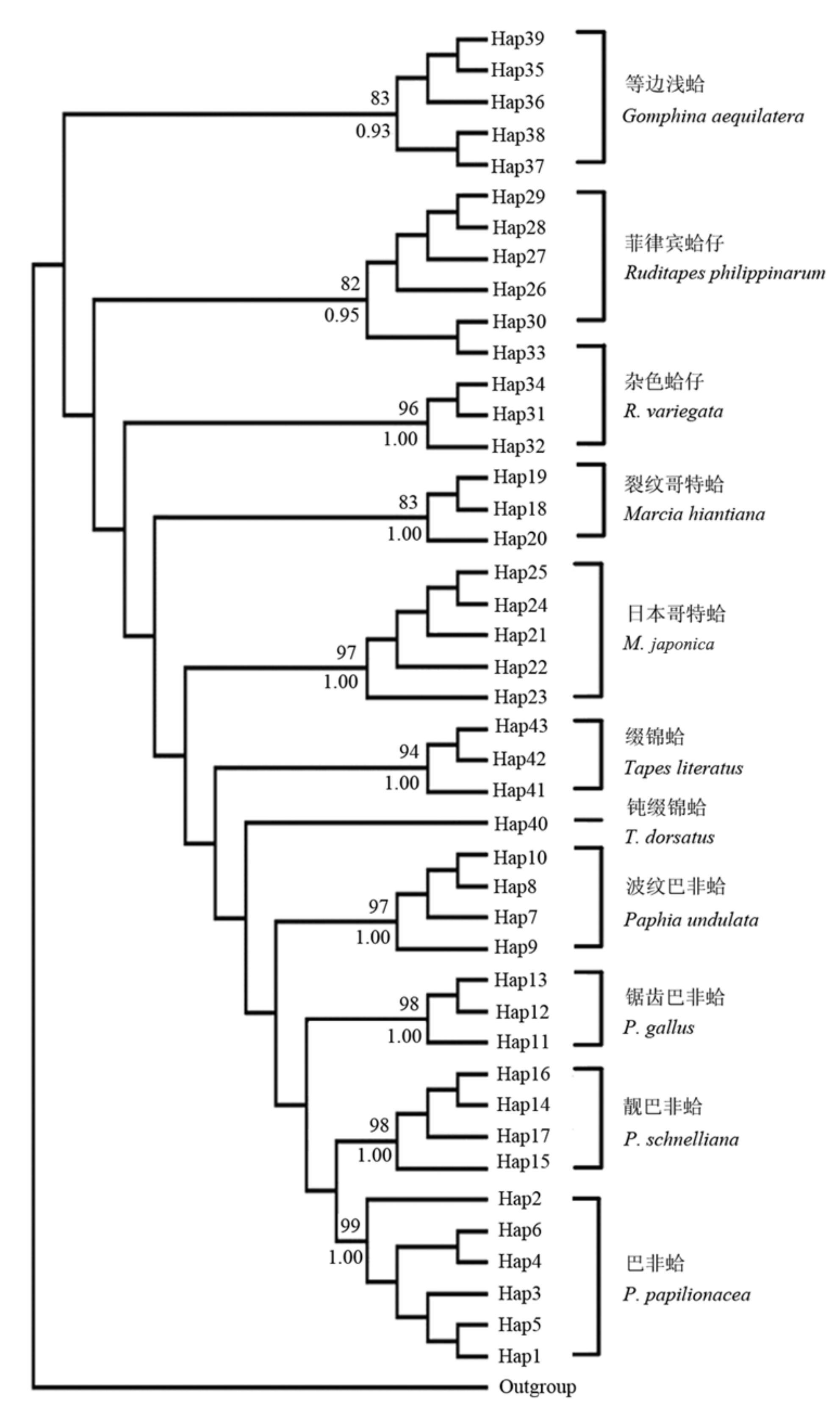


图 2 利用 *COI* 序列构建的邻接(NJ)树

Fig. 2 Neighbor joining tree inferred from partial *COI* sequences

节点处上方显示的数字为自检举值，节点处下方显示的数字为贝叶斯推断树相应节点的后验概率值。

Numbers above the branches indicate bootstrap support values，numbers below the branches indicate Bayesian posterior probability values.

3 讨　论

海南儋州的杂色蛤仔个体 ZSGZ03 与杂色蛤仔其他个体间的遗传距离最小为 28.94%，而与福建漳浦的菲律宾蛤仔个体之间的遗传距离仅为 0.20%。在系统发生树上，此个体也与菲律宾蛤仔个体形成单系，而此单系与杂色蛤仔其他个体组成的单系相互之间是独立的。杂色蛤仔个体 ZSGZ03 水管于基部分离，入水管口缘触手分叉，具备这个种区别于菲律宾蛤仔的典型形态学特征(Zhuang, 2001)。然而，基于 *COI* 的遗传距离和系统发生分析都表明这个杂色蛤仔个体与菲律宾蛤仔个体亲缘关系更为接近。菲律宾蛤仔在中国沿海南北海域都有分布，其分布区与杂色蛤仔分布区有大范围重叠(Zhuang, 2001)。在这种情况下，菲律宾蛤仔与杂色蛤仔这一对姊妹种(sister species)极有可能出现基因交流，故这种现象的出现很可能是由于渗入杂交(introgressive hybridization)或者简单杂交(simple hybridization)引起的(Schlei et al, 2008)。近缘种的基因交流等现象使得应用 DNA 条形码进行物种鉴定变得复杂起来(Moritz & Cicero, 2004)，对于此问题的出现，可以结合进化速率较快的核基因(如 ITS 等)标记来处理(Hebert et al, 2003)。当然，由于营埋栖生活，帘蛤科等异齿亚纲贝类的形态很容易受到底质环境的影响而产生趋同进化(evolutionary convergence)，这种现象的普遍存在使得以形态特征为基础的传统分类变得很不可靠。所以，水管特征并不一定是区分杂色蛤仔和菲律宾蛤仔的鉴别性特征(identification character)，这可能导致了我们对个体 ZSGZ03 的错误鉴定。对于在此个体中出现的这种形态分类和条形码分类结果不一致的现象，我们拟通过增加采样密度、整合形态数据并增加核基因标记来进行进一步研究。

在本研究中，剔除问题单倍型 Hap33，种内遗传差异最大值为 2.02%，平均仅为 0.46%；属内不同种个体间 *COI* 序列遗传差异最小值高达 17.2%，平均为 24.96%。Heber et al(2003)提出用条形码间隙来界定种，这种方法的基础是种间遗传多样性水平要高于种内遗传多样性水平，他认为种内与种间的标准差异阈值(standard divergence threshold value)应该为种内平均遗传距离的 10 倍(10 倍法则)。按照此标准，缀锦蛤亚科贝类条形码差异阈值应该设定 4.6%。除去单倍型 Hap33，利用基于 *COI* 的 DNA 条形码能够将本研究所涉及的缀锦蛤亚科贝类种类全部有效区分开，即使算上问题单倍型 Hap33，成功率仍然高达 98%。Avise et al(2000)认为线粒体基因种内遗传距离大部分都小于 1%，只有极少数情况下会大于 2%，而后者的出现很有可能是研究对象分类地位本身就不明确或存在种间杂交等因素引起的。虽然有研究表明，软体动物线粒体进化速率要高于其他后生动物类群，但是本研究所得到的结果与 Avise 的结论是基本吻合的。同时，本研究也证实了缀锦蛤亚科贝类种间存在条形码间隙，条形码遗传距离阈值法(threshold value)可以用于缀锦蛤亚科贝类种类鉴定。

随着采样规模的扩大，种内最大遗传距离和种间最小遗传距离会重叠交叉，从而导致条形码间隙的消失。在这种情况下，基于系统发生的条形码分析被认为是用来替代遗传距离阈值法的一种有效方法。本研究采用邻接法(NJ)和贝叶斯推断法(BI)建树，除了杂色蛤个体 ZSGZ03，11 种缀锦蛤亚科贝类的各个种在三种树上都聚成单一进化枝，从而证明应用 *COI* 序列构建系统发生树的方法能够对缀锦蛤亚科贝类进行有效的物种鉴定。基于距离的 NJ 树虽然会造成进化信息的缺失(Desalle et al, 2005)，但本研究结果显示，NJ、BI 树拓扑结构基本一致。由于运算时间相对较短，在大量序列存在的情况下，构建 NJ 树的方式更能有效地进行种类鉴定。

本研究中出现了基于形态的传统分类和基于条形码的分子分类结果不一致的现象，我们分析这种现象的出现可能是由于近缘种杂交或者形态鉴别特征不可靠而引起的。尽管如此，基于遗传距离和系统发生树的 DNA 条形码能够将本研究中 98%的个体鉴定到种的水平。11 种缀锦蛤贝类的 DNA 条形码分子生物学分类和形态学分类基本一致。研究结果证明利用基于线粒体 *COI* 序列的 DNA 条形码技术鉴定缀锦蛤贝类种类是具有可行性的。

参考文献：

Avise JC. 2000. Phylogeography: the History and Formation of Species [M]. Cambridge: Harvard University Press.

Ball SL, Hebert PDN, Burian SK. 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes [J]. *J North Am*

Benthol Soc, **24**(3): 508-524.

Chen AH, Li ZX, Feng GN. 2009. Phylogenetic relationships of the genus *Meretrix* (Mollusca: Veneridae) based on mitochondrial *COI* gene sequences[J]. *Zool Res*, **30**(3): 233-239.

Desalle R, Egan MG, Siddall M. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation, and DNA barcoding [J]. *Philos T R Soc B*, **360**: 1905-1916.

Ekrem T, Willassen T, Stur E. 2007. A comprehensive DNA sequence library is essential for identification barcodes [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **43**(2): 530-542.

Johnson SB, Waren A, Vrijenhoek RC. 2008. DNA barcoding of Lepetodrilus limpets reveals cryptic species [J]. *J Shellfish Res*, **27**(1): 43-51.

Kappner I, Bieler R. 2006. Phylogeny of venus clams (Bivalvia: Venerinae) as inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **40**(2): 317-331.

Fischer-Piette E, Metivier B. 1971. Revision des Tapetinae (Mollusques, Bivalves) [J]. *Mem Mus Nat d'Hist Nat Ser A*: *Zool*, **71**: 1-106.

Folmer OM, Black W, Hoeh R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from metazoan invertebrates [J]. *Mar Mol Biol Biotech*, **3**(5): 294-299.

Habe T. 1977. Systematic of Mollusca in Japan: Bivalvia and Scaphopoda [M]. Tokyo: Hokyoryukan, 147-270. (in Japanese)

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symp Ser*, **41**: 95-98.

Harte M. 1992. A new approach to the study of bivalve evolution [J]. *Am Malac Bull*, **9**(2): 199-206.

Hebert PDN, Ratnasingham S, deWard JR. 2003. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species [J]. *Proc R Soc*: *Lond B (Suppl)*, **270**: 96-99.

Keen AM. 1951. Outline of a proposed classification of the pelecypod family Veneridae [J]. *Min Couch Club S Calif*, **113**: 1-10.

Kimura M. 1980. A simple method of estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. *J Mol Evol*, **16**(2): 111-120.

Moritz C, Cicero C. 2004. DNA barcoding: Promise and pitfalls [J]. *PLoS Biol*, **2**(10): 1529-1531.

Nei M, Kumar S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics [M]. New York: Oxford University Press.

Page RDM. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers [J]. *Comput Appl Biosci*, **12**(4): 357-358.

Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging [J]. *Mol Biol Evol*, **25**(7): 1253-1256.

Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, **19**: 1572-1574.

Rozas J, Sanchez DJC, Messeguer X. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. *Bioinformatics*, **19**(18): 2496-2497.

Schlei OL, Crete-Lafreniere A, Whiteley AR. 2008. DNA barcoding of eight North American coregonine species [J]. *Mol Ecol Resour*, **8**(6): 1212-1218.

Shen YB, Li JL, Feng BB. 2009. Genetic analysis of cultured and wild populations of *Mytilus coruscus* based on mitochondrial DNA[J]. *Zool Res*, **30**(3): 240-246.

Tamura K, Dudley J, Nei M. 2007. Mega 4: Molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, **24**(8): 1596-1599.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucleic Acids Res*, **22**: 4673-4680.

Toffoli D, Hrbek T, Araújo MLG, de Almeida MP, Charvet-Almeida P, Farias IP. 2008. A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) [J]. *Genet Mol Biol* (*Suppl*), **31**(1): 324-336.

Ward RD, Holmes HB, O'Hara TD. 2008. DNA barcoding discriminates echinoderm species [J]. *Mol Ecol Resour*, **8**(6): 1202-1211.

Ward RD. 2009. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes [J]. *Mol Ecol Resour*, **9**(4): 1077-1085.

Xia X, Xie Z. 2001. DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution [J]. *J Hered*, **92**(4): 371-373.

Zheng WJ, Zhu SH, Shen XQ, Liu BQ, Pan ZC, Ye YF. 2009. Genetic differentiation of *Tegillarca granosa* based on mitochondrial *COI* gene sequences[J]. *Zool Res*, **30**(1) 17-23. [郑文娟, 朱世华, 沈锡权, 刘必谦, 潘志崇, 叶央芳. 2009. 基于线粒体 *COI* 基因序列探讨泥蚶的遗传分化. 动物学研究, **30**(1): 17-23.]

Zhuang QQ. 2003. Fauna Sinica Phyllum Mollusca Class Bibalvia Family Veneridae [M]. Beijing: Science Press, 157-214. [庄启谦. 2001. 中国动物志软体动物门 • 双壳纲 • 帘蛤科. 北京: 科学出版社, 157-214.]